

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/68, 33/543 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/37420 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. August 1998 (27.08.98) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01041 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Februar 1998 (24.02.98) (30) Prioritätsdaten: 197 07 230.5 24. Februar 1997 (24.02.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: OTTO, Markus [DE/DE]; Lange-Geismar-Strasse 3, D-37073 Göttingen (DE). WILTFANG, Jens [DE/DE]; Südekumweg 12, D-37120 Bovenden-Eddigehausen (DE). SCHÜTZ, Ekkehard [DE/DE]; Beekweg 23, D-37079 Göttingen (DE). (74) Anwälte: REHBERG, Elmar usw.; Am Kirschberge 22, D-37085 Göttingen (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: CA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> |
| (54) Title: PROCESS FOR DIAGNOSING TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERKENNEN EINER ERKRANKUNG EINES ORGANISMUS AN EINER TRANSMISSIBLEN SPONGIFORMEN ENZEPHALOPATHIE (57) Abstract <p>Process for diagnosing transmissible spongiform encephalopathy. The S100 protein β-subunit concentration (βS100) in the blood serum of an organism is determined <i>in vitro</i> and when an upper S100 protein β-subunit concentration is exceeded, this is taken as an indication of the presence of the disease.</p> (57) Zusammenfassung <p>Ein Verfahren dient zum Erkennen einer Erkrankung eines Organismus an einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie. Bei dem Verfahren wird <i>in vitro</i> die Konzentration der β-Untereinheit des Proteins S100 (βS100) in einem Blutserum des Organismus bestimmt. Das Überschreiten einer Grenzkonzentration der β-Untereinheit des Proteins S100 wird als Hinweis auf das Vorliegen der Erkrankung gewertet.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|----------------------------------------------------|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Verfahren zum Erkennen einer Erkrankung eines Organismus an einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Erkennen einer Erkrankung eines Organismus an einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie, wobei in vitro die Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 in einer Körperflüssigkeit des Organismus bestimmt wird und wobei das Überschreiten einer Grenzkonzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 als Hinweis auf das Vorliegen der Erkrankung gewertet wird.

Zu den transmissiblen spongiformen Enzephalopathien gehören die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen, die Traberkrankheit bei Schafen und Ziegen und die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind. Das Entstehen der BSE-Krankheit wird auf das Verfüttern von Tiermehl aus an der Traberkrankheit erkrankten Schafen zurückgeführt. Es besteht der Verdacht, daß

BESTÄTIGUNGSKOPIE

eine neue Form (NVCD) der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit durch Kontakt mit BSE-erkrankten Rindern und/oder den Verzehr von Teilen solcher Rinder beim Menschen ausgelöst werden kann.

Eine Behandlung der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder der BSE-Krankheit ist derzeit nicht möglich. Es ist aber möglich, die Symptome der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit zu behandeln und das Fortschreiten der Krankheit zu verzögern. Von daher ist eine Früherkennung der Krankheit wünschenswert. Daneben ist es wichtig, andere Ursachen einer auftretenden Demenz sicher auszuschließen. Besondere Bedeutung hat die Früherkennung jeglicher Erkrankung an einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie aber auch bei der Erforschung der möglichen Übertragungswege.

Eine absolute Diagnose auf das Vorliegen einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie ist derzeit nur durch einen neuropathologischen Nachweis der pathologischen Isoform des Prion-Proteins im befallenen Gehirngewebe möglich (Prion= Proteinaceous infective Agent). Die Diagnose intravital ist nur differenziell möglich. Sie erfolgt anhand von klinischen und elektroencephalographischen Kriterien. Das Diagnoseergebnis kann durch biochemischen Analysen abgesichert werden. Derzeit werden betreffen solche biochemischen Analysen die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), die auf das Vorliegen bzw. eine erhöhte Konzentrationen der neuronenspezifischen Enolase (NSE), des Proteins 14-3-3 und/oder des Protein S100 untersucht wird.

So ist aus Jimi T, Wakayama Y, Shibuya S, et al. "High Levels of nervous system-specific proteins in cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease" Clin Chim Acta 1992; 211 (1-2): 37-46 ein Verfahren der eingangs beschriebenen Art bekannt.

Aus der US 4 654 313 ist bekannt, Blutserum von Patienten, bei denen ein Verdacht auf eine Gehirnschädigung besteht, auf eine erhöhte Konzentrationen des Proteins S100 zu untersuchen. Hierzu wird auch das Beispiel einer nicht näher spezifizierten Demenz gebracht. Ein Hinweis auf die Erkennbarkeit einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie ist nicht gegeben und angesichts der Besonderheiten des typischen Krankheitsverlaufs mit der zunächst langsam fortschreitenden Gehirnschädigung auch nicht zu erwarten.

Unter der Handelsbezeichnung LIA-mat Sangtec 100 wird von der Firma AB Sangtec Medical, Bromma, Schweden ein quantitativer Immun-Lumineszenz-Serumtest auf das Protein S100 vertrieben. Der Serumtest ist sowohl zur Anwendung in Cerebrospinalflüssigkeit als auch in Blutserum geeignet. Das Protein S100 ist ein saures Kalzium-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 21.000, das als Homodimer und Heterodimer von zwei Untereinheiten α S100 und β S100 natürlich auftritt. Die β -Untereinheit (β S100) tritt spezifisch nur in Glialzellen und Schwannzellen des Gehirns auf. Der bekannte Serumtest reagiert nur auf die β -Untereinheiten (β S100). In der Produktinformation/Bedienungsanleitung zu dem bekannten Serumtest wird darauf verwiesen, daß Gehirnschädigungen, beispielsweise aufgrund von Kopfverletzungen, mit einer erhöhten Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 sowohl in der Cerebrospinalflüssigkeit als auch im Blutserum einhergehen und daher ein Test auf die β -Untereinheit des Proteins S100 zur Quantifizierung des Ausmaßes solcher Gehirnschädigungen herangezogen werden kann.

Es ist bekannt, daß das Protein S100 eine biologische Halbwertszeit von zwei Stunden aufgrund seines Abbaus durch die Nieren aufweist. Bei zeitlich begrenzten Gehirnschädigungen fällt die Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 in der Cerebrospinalflüssigkeit und dem Blutserum daher binnen kurzer Zeit stark ab.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren der eingangs beschriebenen Art so weiterzuentwickeln, daß es mit geringerem Aufwand durchgeführt werden kann. Die Entnahmen von Cerebrospinalflüssigkeit ist grundsätzlich aufwendig. Bei Rindern ist sie invitram mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe bei einem Verfahren der eingangs beschriebenen Art dadurch gelöst, daß die Körperflüssigkeit ein Blutserum des Organismus ist. Überraschenderweise stellt sich heraus, daß sich auch bei der Bestimmung der Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 im Blutserum auffällige Konzentrationen nachweisen lassen, wenn eine Erkrankung an einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie vorliegt. Die erhöhten Konzentrationen der β -Untereinheit des Proteins S100 im Blutserum werden zwar nicht in jedem Fall einer Erkrankung an einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie beobachtet und sie sind auch nicht auf eine solche Erkrankung beschränkt. Die Bestimmung der Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 im Blutserum stellt aber eine einfach sehr wirkungsvolle Ergänzung der bisherigen differenziellen Diagnose von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien dar.

Da Blutserum auch bei Rindern sehr leicht gewonnen werden kann und das neue Verfahren daher insgesamt einen vergleichsweise geringen Aufwand erfordert, sind erstmals Reihenuntersuchungen von Tieren auf eine Erkrankung an BSE möglich. Dabei ist von großem Vorteil, daß die erhöhten Konzentrationen der β -Untereinheit des Proteins S100 bereits dann auftreten, wenn andere Anzeichen für eine Erkrankung an einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie noch nicht oder noch nicht in eindeutiger Weise vorliegen.

Bei dem neuen Verfahren wird nur die Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 bestimmt, weil nur aus dem Gehirn

stammendes β S100 in eindeutiger Weise in Beziehung zu einer Beeinträchtigung des Gehirns steht.

Die Grenzkonzentration, die bei dem neuen Verfahren für das Vorliegen einer Erkrankung an einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie spricht, ist zwischen 150 und 300 pg/ml Blutserum festzulegen. Mit steigender Grenzkonzentration wird naturgemäß die Spezifizität des Kriterium gesteigert, aber seine Sensitivität gesenkt. Die Bandbreite von 150 bis 300 pg/ml Blutserum trägt der Tatsache Rechnung, daß bei verschiedenen Organismen, d. h. beispielsweise verschiedenen Tierarten, die für das Vorliegen einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie sprechende Grenzkonzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 allein aufgrund der allgemeinen Zusammensetzung des Blutserums in gewissen Grenzen schwankt.

Bei Menschen liegt eine sinnvolle Grenzkonzentration zwischen 180 und 260 pg/ml Blutserum und vorzugsweise bei 220 pg/ml Blutserum, d. h. zwischen 200 und 240 pg/ml Blutserum. Die Grenzkonzentration von 220 pg/ml Blutserum hat bei einer Erprobung des neuen Verfahrens eine Sensitivität von etwa 76 % aller definitiven und wahrscheinlichen Fälle von Creutzfeldt-Jakob-Erkrankungen und eine Spezifizität von über 82 % ergeben. Dabei lag der positive Vorhersagewert bei 86 % und der negative Vorhersagewert bei 70 %.

Bei Menschen liegt eine sinnvolle Grenzkonzentration bei 500 pg/ml Blutserum, d. h. zwischen 400 und 600 pg/ml Blutserum.

Die Sensitivität und vor allem die Spezifizität des neuen Verfahrens können noch deutlich gesteigert werden, wenn die Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 in zu verschiedenen Zeiten dem Organismus entnommenen Blutseren bestimmt, wobei nur ein anhaltendes Überschreiten der Grenzkonzentration als Hinweis auf das Vorliegen der Erkrankung gewertet wird. Ein rasches

Abfallen der Konzentration des Proteins S100 deutet auf eine zeitlich begrenzte schädigende Einwirkung auf das Gehirn hin. Bei einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie schreitet die Schädigung des Gehirns mit den bekannten fatalen Folgen jedoch fort. Dies steht in Einklang mit anhaltenden hohen Konzentrationen der β -Untereinheit des Proteins S100 in zu verschiedenen Zeiten dem Organismus entnommenen Blutseren. Durch eine größere Anzahl von Blutseren aus demselben Organismus können auch zufällig niedrige Einzelwerte leichter erkannt und ausgesondert werden, was sich bei der Sensitivität des neuen Verfahrens positiv bemerkbar macht.

Um das neue Verfahren sinnvoll durchführen zu können, muß die Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 in dem Blutserum mit einer Nachweisgrenze und einer Auflösung von jeweils besser als 100 pg/ml Blutserum bestimmt werden. Um eine gute Sensitivität und Spezifität zu erreichen, sollte mit einer Nachweisgrenze und einer Auflösung von jeweils besser als 50 pg/ml Blutserum vorzugsweise von jeweils mindestens 20 pg/ml Blutserum gearbeitet werden.

Bei der Durchführung des neuen Verfahrens kann der bekannte quantitative Immun-Lumineszenz-Serumtest auf das Protein S100 mit Antikörpern zu der β -Untereinheit des Proteins S100 verwendet werden.

Bei diesem Serumtest werden die β -Untereinheiten des Proteins S100 in einem ersten Inkubationsschritt an ihrerseits fixierten Antikörpern fixiert und in einem zweiten Inkubationsschritt mit ihrerseits markierten Antikörpern markiert, wobei die Antikörper monoklonale Antikörper SMST 12, SMSK 25 und SMSK 28 sind.

Die Erfindung wird im folgenden anhand einer konkreten Erprobung des neuen Verfahrens zur Erkennung einer Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung beim Menschen näher beschrieben. Die dabei gewonnenen

Ergebnisse sind aufgrund der übereinstimmenden Eigenschaften anderer transmissiblen spongiformen Enzephalopathien grundsätzlich auf den Nachweis dieser Erkrankungen übertragbar. Insbesondere ist diese Übertragung bezüglich der Erkennung einer BSE-Erkrankung bei Rindern möglich, da die bovine spongiforme Enzephalopathie bekanntermaßen eine besonders große Nähe zu der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit aufweist. Zudem besteht eine ausgeprägte Homologie und eine ausgeprägte Kreuzreaktivität zwischen menschlichem und tierischem S100 Protein.

Es wurde das Blutserum von 224 Patienten untersucht, bei denen ein Verdacht auf das Vorliegen einer Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung bestand. In 65 Fällen wurde die Diagnose auf die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung neuropathologisch bestätigt, 43 Fälle waren wahrscheinliche Erkrankungen, 36 Fälle mögliche Erkrankungen, 6 Fälle waren genetisch bedingte Erkrankungen und 74 Patienten wiesen andere mit einer Demenz einhergehende Erkrankungen auf. Zusätzlich zu diesen 224 Fällen wurde das Blutserum von 35 Patienten mit nicht-Demenz-Erkrankungen untersucht, die als Kontrollstichprobe anzusehen sind.

Eine Einstufung als wahrscheinliche Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung wurde vorgenommen, wenn eine progressive Demenz von weniger als zwei Jahren Dauer vorlag und wenn typische EEG-Veränderungen [periodische Sharp-Wave-Komplexe (PSWC)] vorlagen und wenn mindestens zwei von den folgenden vier klinischen Kriterien erfüllt waren:

1. Myoklonus,
2. visuelle oder cerebelläre Symptome,
3. pyramidale/extrapyramidale Störungen
4. akinetischer Mutismus.

Von einer möglichen Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung wurde ausgegangen, wenn eine progressive Demenz von weniger als zwei Jahren Dauer vorlag und wenn von den oben genannten vier klinischen

Erscheinungsformen 1 bis 4 mindestens zwei gegeben waren, jedoch kein untypisches EEG oder überhaupt kein EEG vorlag. Alle anderen Fälle wurden als andere Erkrankungen eingestuft. Blutserumproben wurden von den Patienten abgenommen und binnen 24 Stunden auf -80°C abgekühlt. Die Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 in den Blutseren wurde unter Verwendung eines quantitativen Immun-Lumineszenz-Serumtests (LIA-mat Sangtec 100 der Firma AB Sangtec Medical, Bromma, Schweden) durchgeführt. Dieser Serumtest ist kommerziell verfügbar. Es handelt sich um einen zweiseitigen Antikörpertest (Sandwichprinzip) mit monoklonalen Antikörpern. Die verwendeten monoklonalen Antikörper SMST 12, SMSK 25 und SMSK 28 reagieren in der Immunreaktion nur mit den β -Untereinheiten des Proteins S100. In einem ersten Schritt werden die β -Untereinheiten des Proteins S100 an ein Substrat angebunden und im zweiten Schritt mit einem Tracer markiert, hierbei handelt es sich um einen Lumineszenz-Tracer. Die Auswertung des Serumtests erfolgt mit einem LIA mat Lumineszenzanalysator der Firma Byk Sangtec unter Verwendung von mit dem Serumtest LIA-mat Sangtec 100 gelieferten Standards. Der Serumtest wurde genau nach der diesem beigefügten Gebrauchsanweisung durchgeführt, auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird.

Alle im folgenden gemachten Angaben über die Sensitivität und die Spezifität des durchgeführten Tests beruhen auf einem 95%-Vertrauensintervall.

In dem beigefügten Boxplot-Diagramm sind die Konzentrationen der β -Untereinheit des Proteins S100 im Blutserum für die definitiven und wahrscheinlichen CJD-Fälle, die möglichen CJD-Fälle, die anderen Demenz- und die nicht-Demenz-Fälle wiedergegeben. In den Boxplots der β S100 Konzentrationen sind die 10er, 25er, 50er, 75er und 90er Perzentilen angegeben, außerdem die Einzelwerte, die außerhalb dieser Bereiche liegen. Im einzelnen lagen die Konzentrationen der β -Untereinheit des Proteins S100 bei den

definitiven und wahrscheinlichen CJD-Fällen, die graphisch zusammengefaßt wurden, zwischen 95 pg/ml Blutserum und 2016 pg/ml Blutserum. Der Mittelwert lag bei 493 pg/ml Blutserum und die Standardabweichung bei 386 pg/ml Blutserum. Bei den Fällen einer definitiven Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung lagen die Konzentrationen zwischen 120 pg/ml Blutserum und 2016 pg/ml Blutserum bei einem Mittelwert von 552 pg/ml Blutserum und einer Standardabweichung von 440 pg/ml Blutserum. Bei den Patienten mit einer wahrscheinlichen Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung lagen die β S100 Konzentrationen zwischen 95 pg/ml Blutserum und 1199 pg/ml Blutserum bei einem Mittelwert von 405 pg/ml Blutserum und einer Standardabweichung von 269 pg/ml Blutserum. Bei den möglichen Fällen einer Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung lag die β S100 Konzentration zwischen 0 pg/ml Blutserum und 742 pg/ml Blutserum, wobei der Mittelwert bei 194 pg/ml Blutserum und die Standardabweichung bei 178 pg/ml Blutserum lag. In der Gruppe der anderen Krankheiten lagen Konzentrationen von 0 pg/ml Blutserum bis 1198 pg/ml Blutserum vor, wobei der Mittelwert bei 151 pg/ml Blutserum und die Standardabweichung bei 177 pg/ml Blutserum lag. Bei den nicht-Demenz-Fällen (Kontrollstichprobe) lagen die Konzentrationen der β -Untereinheit des Proteins S100 zwischen 0 pg/ml Blutserum und 657 pg/ml Blutserum bei einem Mittelwert von 117 pg/ml Blutserum und einer Standardabweichung von 127 pg/ml Blutserum. Die nähere Aufschlüsselung der Konzentrationen der β -Untereinheit des Proteins S100 im Blutserum bei den anderen Demenz-Fällen und den nicht-Demenz-Fällen ist in den Tabellen 1 und 2 aufgeschlüsselt.

Es trat kein signifikanter Unterschied in den Konzentrationen der β -Untereinheit des Proteins S100 zwischen den Fällen der möglichen CJD-Erkrankungen, der anderen Demenz-Erkrankungen und der nicht-Demenz-Erkrankungen auf. Es war jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der definitiven und wahrscheinlichen Creutzfeldt-Jakob-Erkrankungen und den Fällen der anderen Demenz-Erkrankungen festzustellen. Innerhalb der

Gruppe der definitiven und der wahrscheinlichen Creutzfeldt-Jakob-Erkrankungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration des Proteins S100 festgestellt werden. Es wurden auch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der β S100 Konzentration festgestellt.

In dem Boxplot-Diagramm sind die genetischen Fälle nicht aufgelistet. Hierbei handelte es sich um zwei Fälle von tödlicher familiärer Schlaflosigkeit (FFI), bei denen β S100 Konzentrationen von 0 pg/ml Blutserum und 22 pg/ml Blutserum festgestellt wurden. Ein Patient mit Insertmutation wies eine Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 von 178 pg/ml Blutserum auf. Ein am Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) erkrankter Patient und zwei Patienten mit einer V 200I-Mutation wiesen β S100 Konzentrationen von 1434 pg/ml, 296 pg/ml bzw. 757 pg/ml Blutserum auf.

Aus den einzelnen Konzentrationen der β -Untereinheit des Proteins S100 ergaben sich bei einer Grenzkonzentration von 220 pg/ml die besten Ergebnisse bezüglich der Sensitivität und der Spezifität bei der Erkennung einer Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung durch die Bestimmung der Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 im Blutserum. Bei Berücksichtigung der Gruppen definitiver und wahrscheinlicher CJD-Erkrankungen einerseits und der Fälle anderer Demenz-Erkrankungen andererseits betrug die Sensitivität 75,9 % und die Spezifität 82,4 %. Der positive Vorhersagewert lag bei 86,3 % und der negative Vorhersagewert bei 70,1 %. Bei Anwendung derselben Grenzkonzentration auf die Gruppe der nicht-Demenz-Fälle beträgt die Spezifität 85,7 %.

Zwischen der β S100 Konzentration im Blutserum und dem Zeitraum zwischen der Entnahme des Blutserums bis zum Tod des Patienten zeichnete sich ein Zusammenhang ab, nach dem eine niedrigere β S100 Konzentration auf eine höhere verbleibende Lebenserwartung hinweist als eine höhere β S100 Konzentration.

Im einzelnen wurde bei 13 von 16 Patienten, die klinisch zunächst als mögliche Fälle eingestuft wurden und die später neuropathologisch bestätigt wurden, Konzentrationen der β -Untereinheit des Proteins S100 oberhalb von 220 pg/ml gefunden. Zwei Patienten, die anfänglich als andere Fälle eingestuft wurden und dann in die Gruppe der wahrscheinlichen und definitiven Fälle umklassifiziert wurden, wiesen β S100 Konzentrationen von oberhalb 220 pg/ml auf.

Die beigefügten Kaplan-Meier-Kurven zeigen die Überlebensraten von CJD-Erkrankten, die nach der anfangs nachweisbaren Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 im Blutserum in drei verschiedene Gruppen eingeordnet wurden. Aus dem Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven ergibt sich eine Wechselwirkung zwischen der Konzentration von β S100 und der mittelfristigen Mortalität. Die Mittelfristige Mortalität ist umso höher je höher die anfängliche Konzentration an β S100 ist. Anders gesagt weist eine höhere Konzentration an β S100 tendenziell auf einen bereits vorliegenden Krankheitsfortschritt hin; bzw. umgekehrt steigt die Konzentration an β S100 mit dem Fortschritt der CJD-Erkrankung an.

Die Tabelle III dokumentiert die Anwendbarkeit der quantitativen Untersuchung des Blutserums auf die β -Untereinheit des Proteins S100 zur Erkennung einer Scrapie-Erkrankung (einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie) bei Hamstern. Die Stichprobe umfaßte fünf Blutseren von fünf erkrankten Tieren, die teilweise intrazerebral und teilweise abdominal infiziert waren, und fünf Blutseren von gesunden Tieren als Kontrolle. Ein Grenzwert von 500 pg/ml ergibt eine Sensitivität von 80 % und eine Spezifität von 100 %. Ein Unterschied zwischen den intrazerebral und den abdominal infizierten Tieren ist dabei nicht zu erkennen.

P A T E N T A N S P R Ü C H E :

1. Verfahren zum Erkennen einer Erkrankung eines menschlichen Organismus an einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie, insbesondere an der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), wobei in vitro die Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 (β S100) in einer Körperflüssigkeit des Organismus bestimmt wird und wobei das Überschreiten einer Grenzkonzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 als Hinweis auf das Vorliegen der Erkrankung gewertet wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Körperflüssigkeit ein Blutserum des Organismus ist.
2. Verfahren zum Erkennen einer Erkrankung eines tierischen Organismus an einer transmissiblen spongiformen Enzephalopathie, insbesondere an einer bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE), wobei in vitro die Konzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 (β S100) in einer Körperflüssigkeit des Organismus bestimmt wird und wobei das Überschreiten einer Grenzkonzentration der β -Untereinheit des Proteins S100 als Hinweis auf das Vorliegen der Erkrankung gewertet wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Körperflüssigkeit ein Blutserum des Organismus ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Grenzkonzentration zwischen 150 und 600 pg/ml Blutserum beträgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3 rückbezogen auf Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Grenzkonzentration zwischen 180 und 260 pg/ml Blutserum festgelegt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3 rückbezogen auf Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß 500 pg/ml Blutserum, d.h. zwischen 400 und 600 pg/ml Blutserum, beträgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration des Proteins S100 in zu verschiedenen Zeiten dem Organismus entnommenen Blutseren bestimmt wird und daß nur ein anhaltendes Überschreiten der Grenzkonzentration als Hinweis auf das Vorliegen der Erkrankung gewertet wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration des Proteins S100 in dem Blutserum mit einer Nachweisgrenze und einer Auflösung von jeweils besser als 100 pg/ml Blutserum bestimmt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration des Proteins S100 in dem Blutserum mit einer Nachweisgrenze und einer Auflösung von jeweils besser als 50 pg/ml Blutserum und vorzugsweise von jeweils mindestens 20 pg/ml Blutserum bestimmt wird.
9. Verwendung eines quantitativen Immun-Lumineszenz-Serumtests auf das Protein S100 mit Antikörpern zu der β -Untereinheit des Proteins S100 bei der Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
10. Verwendung des Serumtests nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Serumtest die β -Untereinheiten des Proteins S100 in einem ersten Inkubationsschritt an ihrerseits fixierten Antikörpern fixiert und in einem zweiten Inkubationsschritt mit ihrerseits markierten Antikörpern markiert, wobei die Antikörper monoklonale Antikörper SMST 12, SMSK 25 und SMSK 28 sind.

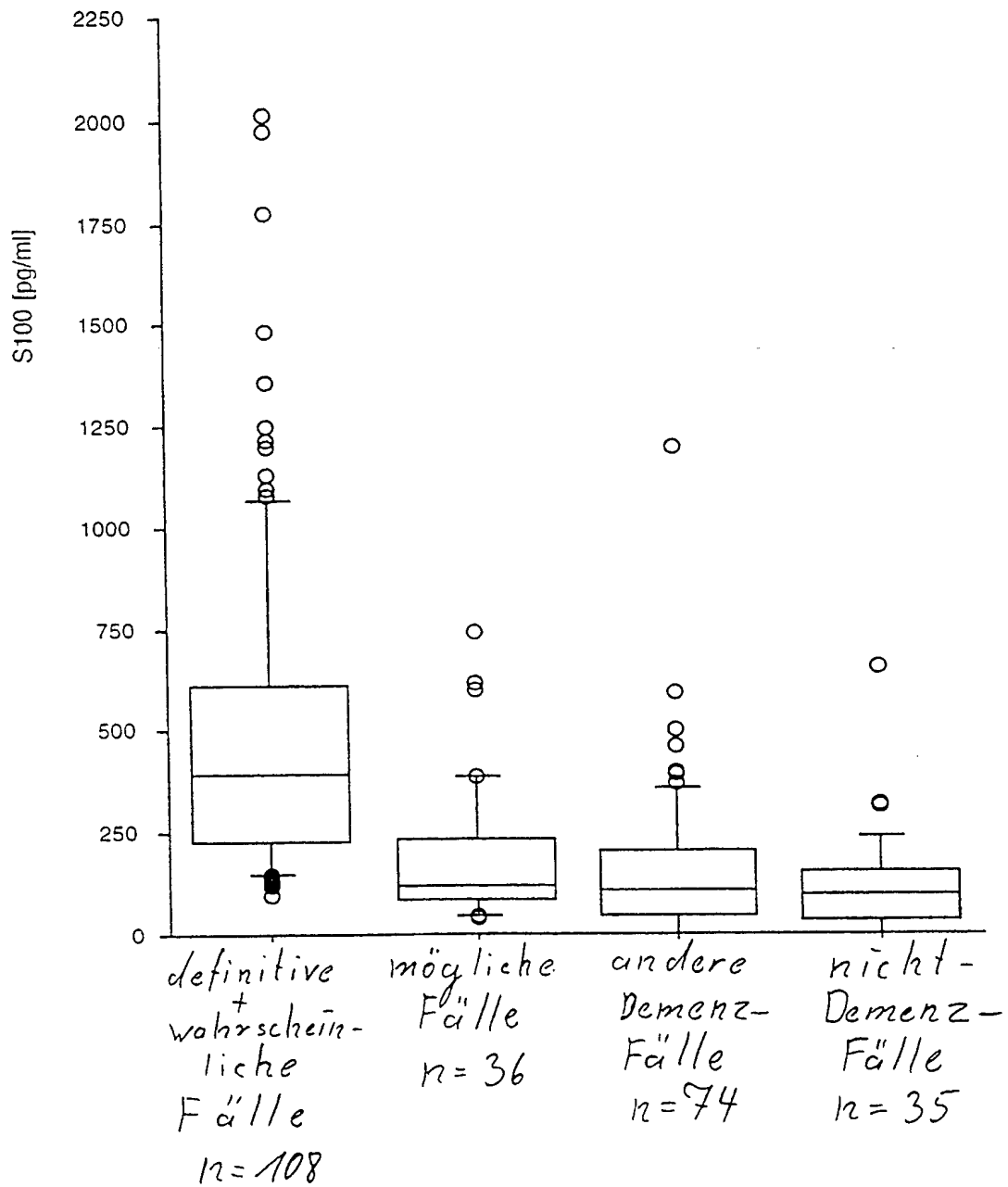
Boxplot-Diagramm

Tabelle I

| Diagnose | Anzahl | Mittelwert / (Bereich) [pg/ml] | SD |
|-------------------------------|--------|--------------------------------------|-----|
| Morbus Alzheimer | 16 (5) | 140 (0-455) | 144 |
| Morbus Parkinson | 11 | 118 (24-243) | 84 |
| Multiinfarkt Demenz | 8 (2) | 143 (0-393) | 130 |
| Progressive Demenz | 5 | 259 (63-592) | 201 |
| Amyotrophe Lateralsklerose | 4 (3) | 72 (0-179) | 83 |
| Chronische Enzephalopathie | 3 | 80 (53-105) | |
| Hypoxischer Hirnschaden | 3 (1) | 178 (40-289) | |
| Enzephalomeningitis | 2 (1) | 851 (504-1198) | |
| Multiple Sklerose | 2 (1) | 257 (142-372) | |
| Morbus Pick | 2 | 68 (20-115) | |
| Wernicke Erkrankung | 2 | 207 (53-360) | |
| Epilepsie | 2 | 33 (29-36) | |
| Depression | 2 | 85 (64-112) | |
| Centrale pontine myelinolyse | 1 | 57 | |
| Subdurales Hämatom | 1 | 84 | |
| Psychose | 1 | 0 | |
| Spinocerebelläre Ataxie | 1 | 28 | |
| Posttraumatischer Hirnschaden | 1 | 130 | |
| Kongophile Angiopathie | 1 | 105 | |
| Hyperparathyroidismus | 1 | 142 | |
| Intoxikation | 1 | 209 | |
| Chorea Huntington | 1 | 59 | |
| Malignantes B-cell Lymphom | 1 | 207 | |
| Thyroiditis Hashimoto | 1 | 0 | |
| Paraneoplastisches Syndrom | 1 | 167 | |

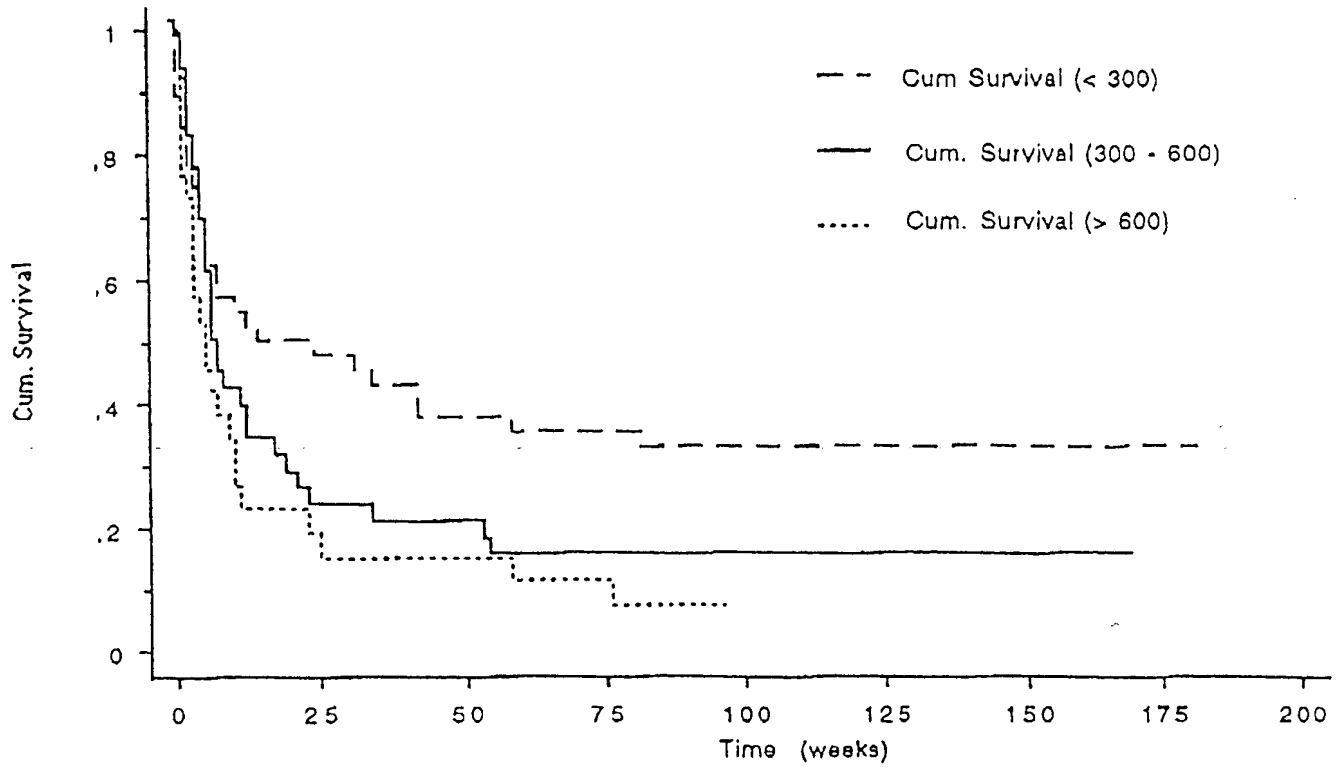
Tabelle II

| Diagnose | Anzahl | Mittelwert / (Bereich) [pg/ml] | SD |
|--------------------------------|--------|--------------------------------------|-----|
| Transiente ischämische Attacke | 6 | 89 (0-188) | 68 |
| Lumboschalgien | 6 | 74 (0-318) | 124 |
| Depression | 4 | 80 (0-178) | 77 |
| Hirntumor | 4 | 164 (73-240) | 86 |
| Polyneuropathie | 4 | 51 (0-108) | 45 |
| nicht erfaßt | 2 | 62 (0-124) | |
| Borreliose | 1 | 58 | |
| Morbus Parkinson | 1 | 125 | |
| Intracraniale Blutung | 1 | 101 | |
| Lungenödem | 1 | 146 | |
| Psychose | 1 | 78 | |
| Amyotrophe Lateralsklerose | 1 | 657 | |
| Guillain-Barré Syndrom | 1 | 187 | |
| Postkolektomei | 1 | 155 | |
| LWS-Fraktur | 1 | 316 | |

Tabelle III

| | Nr. | S100 [pg/ml] | |
|----|------|--------------|---------|
| 1 | S.1 | 2943 | Scrapie |
| 2 | s.4 | 388 | Scrapie |
| 3 | s.5 | 726 | Scrapie |
| 4 | s.7 | 11657 | Scrapie |
| 5 | s.9 | 672 | Scrapie |
| 6 | s.2 | 156 | normal |
| 7 | s.3 | 451 | normal |
| 8 | s.6 | 129 | normal |
| 9 | s.8 | 164 | normal |
| 10 | s.10 | 252 | normal |
| | | | |

Kaplan-Meier - Kurven



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/01041

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/68 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P, X | S POSER, I ZERR, W J SCHULZ-SCHAEFFER, H A KRETZSCHMAR, K FELGENHAUER: "Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. Eine Sphinx der heutigen Neurobiologie" DEUTSCHE MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT, vol. 122, no. 37, 12 September 1997, pages 1099-1105, XP002071129 see the whole document --- -/-- | 1-10 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 July 1998

Date of mailing of the international search report

04/08/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/01041

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P,X | <p>M OTTO, H STEIN, A SZUDRA, I ZERR, M BODEMER, O GEFELLER, S POSER, H A KRETZSCHMAR, M MÄDER, T WEBER: "S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease"</p> <p>JOURNAL OF NEUROLOGY (ZEITSCHRIFT FÜR NEUROLOGIE),</p> <p>vol. 244, no. 9, September 1997,</p> <p>pages 566-570, XP002071130</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-10 |
| P,X | <p>M OTTO, J WILTFANG, E SCHÜTZ, I ZERR, A OTTO, A PFAHLBERG, O GEFELLER, M UHR, A GIESE, T WEBER, H A KRETZSCHMAR, S POSER: "Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study"</p> <p>BMJ (CLINICAL RESEARCH ED.),</p> <p>vol. 316, no. 7131, 21 February 1998,</p> <p>pages 577-582, XP002071131</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-10 |
| Y | <p>T JIMI, Y WAKAYAMA, S SHIBUYA, H NAKATA, T TOMARU, Y TAKAHASHI, K KOSAKA, T ASANO, K KATO: "High levels of nervous system-specific proteins in cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease"</p> <p>CLINICA CHIMICA ACTA,</p> <p>vol. 211, no. 1-2, 15 October 1992,</p> <p>pages 37-46, XP002071132</p> <p>cited in the application</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-10 |
| Y | <p>K KATO, F SUZUKI, N KUROBE, K OKAJIMA, N OGASAWARA, M NAGAYA, T YAMANAKA: "Enhancement of S-100-beta Protein in Blood of Patients with Down's syndrome "</p> <p>JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE,</p> <p>vol. 2, no. 2, 1990,</p> <p>pages 109-113, XP002071133</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-10 |
| Y | <p>O C FAGNART, C J M SINDIC, C LATERRE: "Particle Counting Immunoassay of S100 Protein in Serum. Possible Relevance in Tumors and Ischemic Disorders of the Central Nervous System"</p> <p>CLINICAL CHEMISTRY,</p> <p>vol. 34, no. 7, 1988,</p> <p>pages 1387-1391, XP002071134</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/01041

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y | US 4 654 313 A (HARTMAN BOYD K) 31 March 1987 cited in the application see the whole document ----- | 1-10 |
| A | US 4 892 814 A (HARRINGTON MICHAEL G ET AL) 9 January 1990 see the whole document ----- | 1-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/01041

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|-------------------------------------------|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 4654313 | A | 31-03-1987 | NONE | |
| US 4892814 | A | 09-01-1990 | NONE | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intel 3nales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01041

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/68 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| P, X | S POSER, I ZERR, W J SCHULZ-SCHAEFFER, H A KRETZSCHMAR, K FELGENHAUER: "Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. Eine Sphinx der heutigen Neurobiologie" DEUTSCHE MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT, Bd. 122, Nr. 37, 12. September 1997, Seiten 1099-1105, XP002071129 siehe das ganze Dokument --- -/-- | 1-10 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Juli 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/08/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hart-Davis, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| P,X | <p>M OTTO, H STEIN, A SZUDRA, I ZERR, M BODEMER, O GEFELLER, S POSER, H A KRETZSCHMAR, M MÄDER, T WEBER: "S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease"</p> <p>JOURNAL OF NEUROLOGY (ZEITSCHRIFT FÜR NEUROLOGIE), Bd. 244, Nr. 9, September 1997, Seiten 566-570, XP002071130 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-10 |
| P,X | <p>M OTTO, J WILTFANG, E SCHÜTZ, I ZERR, A OTTO, A PFAHLBERG, O GEFELLER, M UHR, A GIESE, T WEBER, H A KRETZSCHMAR, S POSER: "Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study"</p> <p>BMJ (CLINICAL RESEARCH ED.), Bd. 316, Nr. 7131, 21. Februar 1998, Seiten 577-582, XP002071131 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-10 |
| Y | <p>T JIMI, Y WAKAYAMA, S SHIBUYA, H NAKATA, T TOMARU, Y TAKAHASHI, K KOSAKA, T ASANO, K KATO: "High levels of nervous system-specific proteins in cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease"</p> <p>CLINICA CHIMICA ACTA, Bd. 211, Nr. 1-2, 15. Oktober 1992, Seiten 37-46, XP002071132 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-10 |
| Y | <p>K KATO, F SUZUKI, N KUROBE, K OKAJIMA, N OGASAWARA, M NAGAYA, T YAMANAKA: "Enhancement of S-100-beta Protein in Blood of Patients with Down's syndrome"</p> <p>JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, Bd. 2, Nr. 2, 1990, Seiten 109-113, XP002071133 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-10 |
| Y | <p>O C FAGNART, C J M SINDIC, C LATERRE: "Particle Counting Immunoassay of S100 Protein in Serum. Possible Relevance in Tumors and Ischemic Disorders of the Central Nervous System"</p> <p>CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 34, Nr. 7, 1988, Seiten 1387-1391, XP002071134 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-10 |
| | <p>---</p> <p>-/--</p> | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01041

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|

| | | |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Y | US 4 654 313 A (HARTMAN BOYD K) 31.März 1987 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- | 1-10 |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|

| | | |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| A | US 4 892 814 A (HARRINGTON MICHAEL G ET AL) 9.Januar 1990 siehe das ganze Dokument ----- | 1-10 |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------|------|

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01041

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 4654313 A | 31-03-1987 | KEINE | |
| US 4892814 A | 09-01-1990 | KEINE | |